



TITLE:

抗生物質による酵素阻害反応に関する研究(第一報)不飽和ケトンによるパ、イン作用の阻害

AUTHOR(S):

渡辺, 稔; 岡田, 邦久; 森, 量夫; 伊藤, 信夫

CITATION:

渡辺, 稔 ...[et al]. 抗生物質による酵素阻害反応に関する研究(第一報)不飽和ケトンによるパ、イン作用の阻害. 防虫科学 1952, 17(1): 1-6

ISSUE DATE:

1952-03-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/156731>

RIGHT:

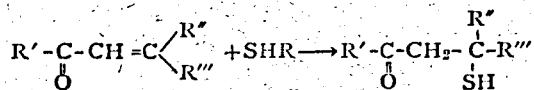
Studies on the Inhibition of Enzymes by the Antibiotics. Part. 1. Inhibition of Papain by Unsaturated Ketones. By MINORU WATANABE, Kunihiisa OKADA, Kazuo MORI and Nobuo ITO (Department of Agricultural Chemistry, Hokkaido University.)
Received Dec. 14, 1951. *Botyu-Kagaku* 17, 1, 1952 (with English résumé 5)

1. 抗生物質による酵素阻害反応に関する研究 (第一報) 不飽和ケトンによるパ、イン作用の阻害 渡辺 稔, 岡田邦久, 森 量夫, 伊藤信夫 (北海道大学 農学部 農芸化学科)

26. 12. 14 受理

不飽和ケトンは殺虫作用を有しておるものであつて、1933年 Gnadinger⁽¹⁾ は Benzophenone を Peet—Grady 法による殺虫試験の標準物質として採用しており、長瀬⁽²⁾ は除虫菊燃焼によつて生ずる殺虫成分の研究を詳細に行つて、この場合 Acetophenone 等が生ずる事を確認し、更にこれ等を基礎とした一連の化合物の殺虫効果を試験して Benzophenone が強力な燐蒸剤であると報告しており、又最近では Smith⁽³⁾ 等、高野⁽⁴⁾ 等の研究がある。しかし殺虫作用の立場から不飽和ケトンの作用機構を検討した報告も無く、又他の一般的な抗生物質作用機構の説明も全て不飽和ケトンの殺虫作用機構の解明には不十分である。

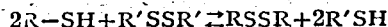
不飽和ケトンは斯くの如く強力な殺虫力を有しているが同時に抗菌作用をも有しており、これに就いては Freedlander,⁽⁵⁾ Geiger,⁽⁶⁾ McCown⁽⁷⁾ 等の数多くの報告がある。特に Geiger and Conn は抗菌作用機構の追究を詳細に行い、微生物の代謝産物である Clavacin, Penicillic acid の抗菌作用が過剰のマーカプト酢酸塩又はシステインによつていづれも不活性化され、又チオ硫酸ソーダが Clavacin の作用を阻止する事から、これ等抗生物質の作用はその構造中の α, β 不飽和ケトン基によるものであつて、これが微生物の酵素中の SH 基を封鎖する爲であると述べて次の如き模式をあげている。



又 Methyloxide, Isophron, Indalon, Benzalacetophenone, Acrylophenone 等の他の α, β 不飽和ケトンに就いてもその発育抑制作用を試験し、これ等の内で Acrylophenone のみが高度の活性を示し、しかもこの作用はマーカプト酢酸塩とシステインによつて阻止されるが、Benzalacetophenone の様な低い活性の化合物は阻止されない事を認め、これは不飽和ケトン基の化学的反応性の差異によると説明している。一般にこの SH 反応説が認められているがこれ等の事実だけでは広義の抗生物質作用機構の解明に次の点から考えて十分ではないと考えられる。即ち必須代謝産物

の中には SH 基を含むものが非常に多くあるので、SH 基と拮抗すると云う問題に対して現象論的に特異性を直ちにこれだけで証明する事は不可能であらう。例えば Penicillic acid, Clavacin 等の作用は生体に於ける活性の SH 化合物を不活性化させるものであつて、この作用が添加した SH 化合物 (マーカプト酢酸塩, システイン, チオ硫酸ソーダ) によつて打消されると云う事実をこの SH 説の根拠としているがこの打消しに使われた SH 化合物が事実上代謝物質であるかどうかは全く考えに入れていないのである。このように不飽和ケトンの作用を不活性化する物質があつてもそれが直ちにその作用機構を説明するのに十分な根拠を与え得るものとは思われない。筆者等はこのような考察のもとに、生活細胞に不飽和ケトンを加える事によつてそこに起る個々の現象からその作用機構を解析する事もこの機構を解明する上に重要な方法と考え、先づ Papainase に対する不飽和ケトンの作用を生活細胞に生成する代謝物質の拮抗と単一酵素に対する抑制作用との関連性の面から追求した。

尚 Papainase の作用機構に就いては古くから論議され、Bersih,⁽⁸⁾ Grassmann,⁽⁹⁾ Machmann and Helmet,⁽¹⁰⁾ Mayer and Borgen⁽¹¹⁾ 等は Papainase の活性基はチオール系からなり、その活性化は次の如き可逆反応に基くとしている。



Papainase がシステイン, 硫化水素, 青酸等により活性化されるのはこれ等の物質が還元作用を有する事によると述べている。Repley⁽¹²⁾ はアスコルビン酸の酸化還元と Papainase の活性化との関係からこの説を支持しており、又 Krebs,⁽¹³⁾ Hellermann,⁽¹⁴⁾ Balls⁽¹⁵⁾ 等も SH 基はこの酵素作用に不可欠であると述べている。これに反して Bergmann⁽¹⁶⁾ はフェニールヒドラジン及びヒドロキシアルミンにより阻害せられ、又過酸化水素で作用力を減ずる事から $-\text{CO}$ 基を、又奥村⁽¹⁷⁾ は $-\text{CHO}$ 基を有すると結論している。最近 Jaffe⁽¹⁸⁾, 志村⁽¹⁹⁾ 等は Papainase は 2 つ或いはそれ以上の作用基を含む酵素の複合体か、又は異つた方法により活性化される異つた中心を有する

酵素であると考えている。筆者等も Papainase は SH 基をも含む 2 つ或いはそれ以上の活性基を含むものと考え、不飽和ケトンの抗生作用機構の解明と共に Papainase の作用機構に関してもその解明に努めた。

実験方法

実験に用いた不飽和ケトンは次のものである。

Acetophenone, Acrylophenone, Benzophenone, Benzalacetophenone, Furfuralacetone, Furfuralacetophenone. これ等は何れも文献記載の方法により合成し、その特数によつて確めた。供試化合物は何れも水に不溶なので常法により酒精に溶解して水で稀釈し 0.1% 酒精溶液として使用した。対照試験として同量の 0.1% 酒精を添加したが阻害作用も又特に賦活作用も認められなかつた。酵素試料は Papainase として Papain を用いた。Papain は市販のものを更に一度酒精沈澱法により精製し、使用直前に 0.5% 水溶液として使用した。基質は市販のゼラチンを酒精沈澱法により数回精製を繰返し、この精製ゼラチンをクエン酸緩衝液 (PH 5.0) に 3% になるように溶解し基質とした。Papain 作用の測定法には、蛋白質の分解により生じたアミノ基或いはカルボキシル基を定量する方法、反応液中の非蛋白態窒素を定量する方法等もあるが、筆者等は Northrop⁽⁴⁰⁾ の粘度法によつて測定した。

反応混合物の組成はゼラチン基質溶液を $35 \pm 0.1^\circ$ の恒温水槽中に 15—18 分間保ち、これを Ostwald 粘度計の地球中に 10cc 入れ、数回粘度を計り一定値となつた後予め同温度に保つた酵素液 0.2cc を直接添加し、手早く少量の空気を吹込みよく反応物を混和し次いで一定時間毎にその粘度を測定した。被験藥物、賦活物質の添加は各実験の目的によつて夫々所要の時に行つた。又これ等の物質の添加量は後述の如く夫々の実験によつて適當に定めた。測定値は落下時間の比のみを以つて相対粘度とし、比粘度 η_{sp} は $\eta_{sp} = \frac{t_g}{t_0} - 1$ として算出した。 t_g , t_0 はゼラチン及水の落下時間である。

結果及び考察

先づ反応混合液中に上記の不飽和ケトンを当初より添加して見ると Fig.1 に見る如く、Papain の作用に対して顯著な阻害作用を示した。その中でも Furfuralacetophenone の阻害作用が最も大であり、次いで Furfuralacetone, Benzalacetophenone, Acrylophenone, Benzophenone, Acetophenone の順に阻害作用は弱くなつていく。前述の研究者達による殺虫試験に於ては Benzophenone が最も強力に作用し、又 Ceiger and Conn の行つた抗菌試験の結果によると、細菌に対しては Acrylophenone が、糸状菌に対しては Furfuralacetophenone が最大の

抗菌作用を示しており、これ等抗生作用試験の結果と本実験に於ける Papain 阻害作用との間には特に関連性は見られない。又この Papain 作用の阻害には不飽和ケトンと基質との間に直接的な関係が見られる。即ち不飽和ケトンが酵素の反応速度を減少させるのではなく、不飽和ケトンと基質とが酵素の同一の活性中心を奪ひ合う銀を呈しており、この阻害は所謂競争的抑制によるものと考えられる。

Bergmann は活性化された Papain は「合成ペプチドを分解し、フェニールヒドラジンにより強く阻害せられ、所謂 Peptidase としての作用の強い Papain I」と「天然蛋白を分解するが、合成ペプチドを分解せず、フェニールヒドラジンにより阻害されない Proteinase としての作用の強い Papain II」とに分けられると述べている。筆者等も不飽和ケトンの阻害作用を、Papain を Proteinase と Peptidase に分けて考察して見た。フェニールヒドラジン ($5 \times 10^{-2} M$) による阻害は、前述の粘度法では反応開始後約 10 分迄は認められない (Fig. 1A)。故に志村等も考

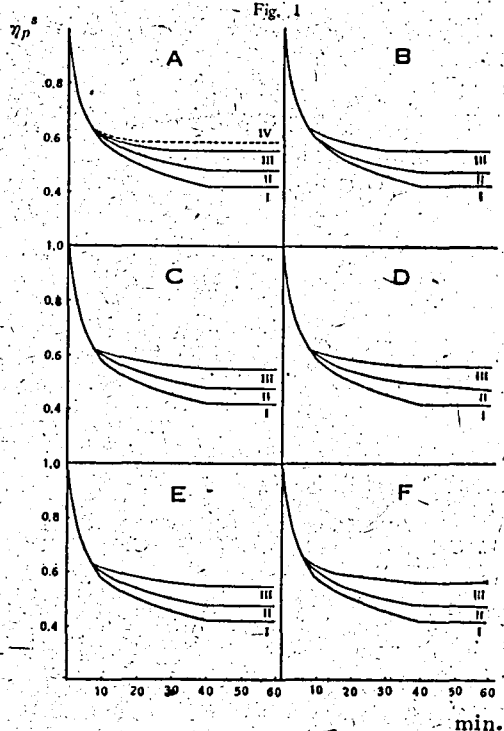


Fig.1 Inhibition of Natural Papain by Unsaturated Ketones.

- A: Inhibition by acetophenone
- B: Inhibition by acrylophenone
- C: Inhibition by benzophenone
- D: Inhibition by benzalacetophenone
- E: Inhibition by furfuralacetone
- F: Inhibition by furfuralacetophenone

I: Control, II: 3×10^{-7} M drugs added, III: 5×10^{-7} M drugs added, IV: 5×10^{-7} M phenylhydrazine added. The reaction mixture (total volume 10.4cc) contains 10cc of citrate buffer of pH 5.0 containing 0.3g of gelatine, 0.2cc of 0.5% enzyme solution and 0.2cc of drugs solution to make a final concentration of 3×10^{-7} M, or 5×10^{-7} M.

えている如く Papain の作用の内、反応後10分迄を Proteinase 作用、その以後を Peptidase 作用と見なす事が出来る、このような立場から Fig.1 の阻害曲線を見ると不飽和ケトンには Proteinase には作用を示さず、Peptidase に対して作用すると云い得る、

以下図表上括弧内の略号を使用する—非活性 Papain (N.A.P), 胃酸活性化 Papain (H.A.P), システイン活性化 Papain (C.A.P), Furfuralacetophenone (F.A), チオ硫酸ソーダ (S.T.S)。

前述したように Geiger 等は不飽和ケトンの抗菌作用機構に於て SH 説を考へており、これに対し古くから Cooper (21) は1分子内に α, β 不飽和ケトン基を2個有するキノ系化合物が抗菌作用を示すのは、これ等の化合物が生体内の蛋白質、或いはアミノ酸のアミノ基と結合する爲としている、筆者等も供試不飽和ケトンとアミノ基との拮抗作用の有無を知ろうとして、

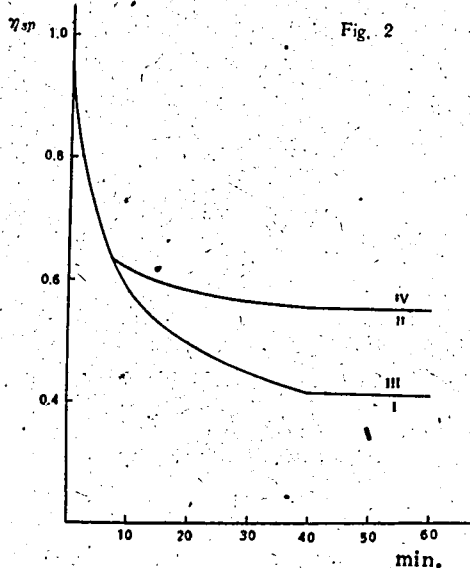


Fig.2 Inhibition of Papain by Furfuralacetophenone and the Antagonistic Action of Amino Acids.

- I: Natural papain (N.A.P).
- II: NAP+Furfuralacetophenone (F.A)
- III: NAP+amino acid.
- IV: NAP+FA+amino acid.

Same as the preceding experiment, except addition of 5×10^{-7} M amino acids.

グリコール、ヒスチジン、ロイシン、チロシン (5×10^{-7} M) を加へ、Furfuralacetophenone の Papain 作用に対する阻害を検したが、Fig. 2 に見る如く何等拮抗作用は見られなかつた。更にアミノ酸の濃度を 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M, とし、又他の不飽和ケトン、或いは胃酸活性化 Papain を用いても同様であつて、本実験に於ては全く不飽和ケトンとアミノ基との間に拮抗作用は無いと云い得る。

次に Papain の活性化剤に就いては古くから多くの研究があり、作用基の検討が種々なされているが、これ等活性化剤と、或いはこれ等によつて活性化される作用基と不飽和ケトンとの間に何等かの拮抗作用的関連性があるのではないかと云う事も考えられる。奥村は非活性 Papain の作用を阻害するのは反応生成物であるポリペプチド自身であるとし、胃酸による活性化はそのポリペプチドの除去による事を証明している。即ち胃酸活性化は Papain の初期の反応の以後に関係すると思へられている。この胃酸による活性化と不飽和ケトンの阻害作用との拮抗作用を検した。尚胃酸は3%溶液 0.1cc を用いた (胃酸による活性化には若干の時間を要すると云はれ、Willstätter (22)

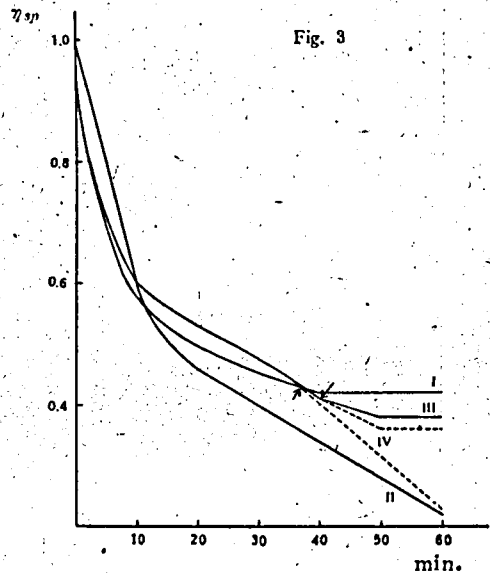


Fig.3 Inhibition of Papain by Furfuralacetophenone and the Antagonistic Action of Hydrocyanic Acid.

- I: NAP II: Hydrocyanic activating papain (HAP)
- III: HAP+FA IV: Arrows indicate addition of 0.1cc of 3% hydrocyanic acid.

Same as the preceding experiment, except that 0.1cc of 3% hydrocyanic acid was added at the initial period or peptidase process.

等は60分で最高値に達し、それ以後は殆んど一定値になると云う。志村等は粘度法に於て胃酸添加直後に測定したもので速効的効果が見られ、60分迄は殆んど同じ活性効果を示したと報告しており、筆者等も対照試験に於て同様の結果を得たので、胃酸溶液を直接添加し、その直後より測定した。その結果は Fig.3 に見られる如く胃酸活性化 Papain に対する不飽和ケトンの作用は全く非活性化 Papain に対する阻害作用と同様で、胃酸による活性化と不飽和ケトンの阻害作用との間には拮抗的作用が無い。又胃酸活性化 Papain に対する不飽和ケトンの阻害途中に再び胃酸を添加する事によつて阻害作用が除去され得ぬかと考え、反応開始後40分に於て添加したが拮抗作用は見られなかつた。即ちこの実験に於ては不飽和ケトンの作用は胃酸とも、又胃酸により活性化される作用基とも拮抗せず、その活性化様式に関係が無い。

システインによつて Papain が活性化される事から、Bersin 等はこの酵素自身がチオール系よりなり、Papain のシステインによる活性化は可逆的な還元により SH 基が遊離になる爲として、SH 説を唱えている。それで筆者等は常法により、システイン塩酸塩 10mg を酵素液 2cc 中を含む如くにして Papain を

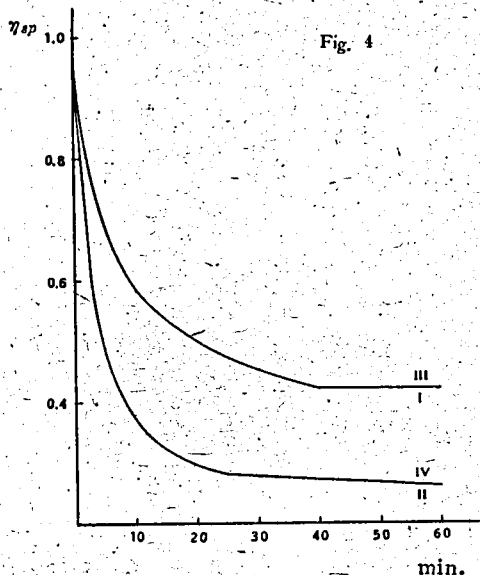


Fig.4 Inhibition of Papain by Furfuralacetophenone and the Antagonistic Action of Cysteine.

I: NAP II: Cysteine activating papain(CAP)

III: NAP+FA+ Cysteine IV: CAP+FA

Same as the preceding experiment, except that 10mg papain was activated by 1mg. cysteine before addition of drugs, or $5 \times 10^{-2}M$. cysteine was added at the initial period.

予め活性化させておき、これに対する不飽和ケトン ($5 \times 10^{-2}M$) の作用を見ると Fig.4 の下の2曲線の如くであつて、全く阻害作用は見られない。

又システインの量を 1/2 としても同様の結果が得られた。次にシステインを不飽和ケトンと当量、反応時に加えて見たが阻害作用は全く無かつた。(Fig.4, 上の曲線) 又 Furfuralacetophenone を以つて非活性化 Papain の作用を阻害している反応途中にシステイン 1mg を加えると、Fig.5 の如く Furfuralacetophenone による阻害は消失して作用曲線は予めシステインで活性化されたものと重なる。以上の事実からシステインと、或いはシステインにより活性化された Papain の作用基と不飽和ケトンは明らかに拮抗作用を有し、しかも不飽和ケトンと Papain 活性基との結合は比較的弱いものと考えられる。

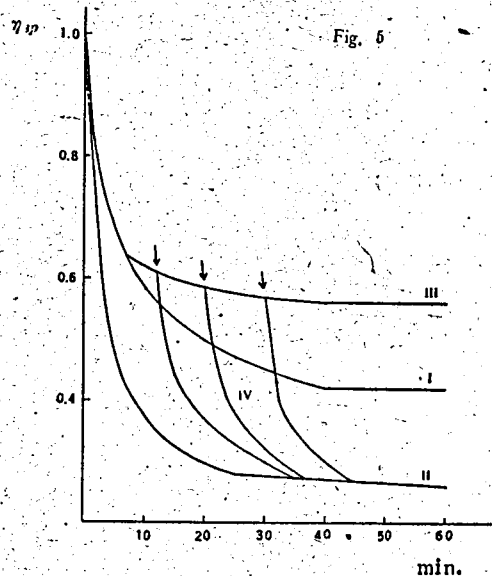


Fig.5 Antagonistic Action of Cysteine.

I: NAP II: CAP III: NAP+FA

IV: Arrows indicate addition of 1mg. Cysteine.

Condition same as in Fig.4, except that 1mg. cysteine was added at peptidase process.

Jaffé はチオ硫酸ソーダが Papain のゼラチン分解に活性作用を示す事を認め、この活性化は Bergmann の説の如くチオ硫酸ソーダが助酵素として作用するのではないかと考えている。筆者等はチオ硫酸ソーダと不飽和ケトンの関係を同様の方法で検したが Fig.6 の如く拮抗作用を示さなかつた。

以上を総括して見る時、不飽和ケトンは Papain の作用を阻害し、しかもその阻害は競争的抑制によるものと考えられる。又 Papain の作用を Proteinase と Peptidase に分けて考察すれば、不飽和ケトンは

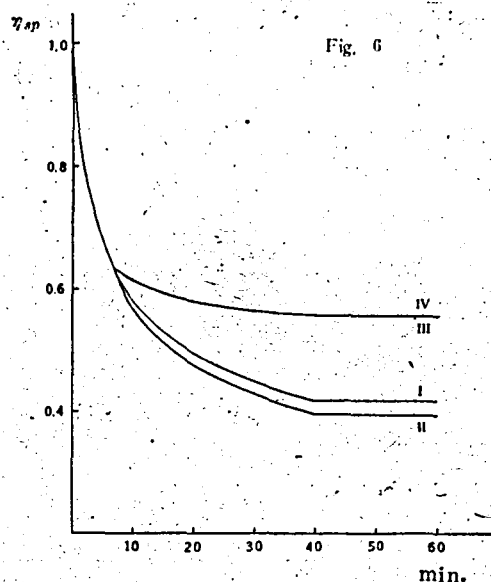


Fig.6 Inhibition of Papain by Furfuralacetophenone and the Antagonistic Action of Thiosulfate.

I : NAP II : NAP+Thiosulfate (STS)
 III : NAP+FA IV : NAP+FA+STS
 Conditions same as in Fig.1, except that 1mg. sodiumthiosulfate was added.

Proteinase を阻害しないで、Peptidase を阻害する。Papain の作用に対し不飽和ケトン はシステイン と 顕著な拮抗作用を有するが、アミノ基とは拮抗しない。又 Papain に 毒酸により活性化される作用基が有るとすればその作用基とも拮抗しない。更に上述の諸実験の結果から、Papain は SH 基を含む2つ或いはそれ以上の作用基を含む酵素の複合体か、或いは異なった方法により活性化される異なった中心を持つものであると云う説は正しいものと考えられる。

更に他の単一酵素作用に対する作用並びに拮抗物質を検討する事によつて、不飽和ケトンの殺虫作用機構をはじめ広義の抗生作用機構を解明したいと思う。(昭和26年5月、日本農芸化学会大会にて発表)

Résumé

The antibiotic mechanisms of unsaturated ketones, some of which are now known to be important as insecticides or antibacterials, are not yet appreciated in spite of many investigations, Cooper suggested that the antibacterial effect of the α, β -unsaturated ketone was due to its reactivity upon amino groups and some investigators attributed the effect to the reactivity upon SH groups essential to living systems.

In order to clarify the mechanisms and the phenomenal specificity as antibiotics, the present authors have studied the inhibitory action of some α, β -unsaturated ketones, as acetophenone, benzophenone, benzalacetophenone, acrylophenone, furfuralacetone and furfuralacetophenone, to papain activity. The activity and its inhibition by the ketones were measured upon gelatine solution by Northrop's viscosimetric method, and the results are represented in Fig.1.

Each ketone inhibited the enzyme activity evidently and furfuralacetophenone was the most powerful inhibitor. These results indicated that there was not any relation between the enzyme inhibiting action of the ketones and these antibacterial or insecticidal activities, already reported by many authors. And the inhibition form of the ketone to the enzyme might be considered as competitive one.

To find out the metabolite antagonist of the inhibitors, the present authors investigated the antagonistic actions of amino acids, hydrocyanic acid, cysteine and thiosulfate, known as the activators of the enzyme, to the ketone upon inactivated papain, and the behavior of HCN and cysteine-papain to the ketone. Cysteine antagonized to the equivalent ketone, but the other activators of papain had no effect. So the inhibition by the ketone is related to the sulfhydryl groups, probable in papain, which should be activated by cysteine. (Fig. 2-6)

The ketone did not inhibit the Bergmann's papain proteinase, but his peptidase. And not all activators of papain antagonized to the enzyme-inhibiting ketone, so the present authors support the theory that papainase is a mixture of different enzymes, or that it possesses various centers which are activated in a different way.

- (1) Gnadinger, C. B.: Pyrethrum flowers, (1933)
- (2) 長瀬 誠: 農化., 18, 187 (1941)
- (3) Smith, H. F. and Carpenter, C. P.: J. Ind. Hyg. Toxicol., 25, 269 (1944) 30, 63 (1948)
- (4) 高野武之助, 上田陸生, 村沢 勇, 大野 稔: 防虫科学., 7, 11 (1947)

- (5) Freedlander, B. L.: Proc. Soc. Exptle. Biol. Med., **5**, 153 (1942)
- (6) Geiger, W. B. and Conn. J. E.: J. Am. Chem. Soc. **67**, 112 (1945); Arch. Biochem., **16**, 423 (1948)
- (7) McCown, J. C., et al.: Ann. Appl. Biol., **35**, 25 (1948)
- (8) Bersin, T.: Erg. Enzymforschung, **4**, 68 (1935)
- (9) Grassmann, W.: Z. angew. Chem., **44**, 105 (1911)
- (10) Maschmann, E. and Helmet, E.: Z. Physiol. Chem., **220**, 199 (1933)
- (11) Mayer, T. and Borger, G.: Biochem. Z., **273**, 56 (1934)
- (12) Reply, K. V. G. and Seshagisirs, P.: Science and Culture, **7**, 510 (1942)
- (13) Krebs, H. A.: Biochem. Z., **220**, 280 (1930)
- (14) Hellermann, L. and Perkins, M. E.: J. Biol. Chem., **107**, 241 (1934)
- (15) Balls, A. K.: J. Biol. Chem., **130**, 609 (1939)
- (16) Bergmann, M. and Ross, W. F.: J. Biol. Chem., **114**, 717 (1936)
- (17) Okumura, S.: Bull. Soc. Chem. Japan; **13**, 534 (1938); **14**, 161 (1939)
- (18) Jaffe, W. G.: Arch. Biochem., **8**, 385 (1945)
- (19) Northrop, J. H.: J. gen. Physiol., **16**, 41 (1932)
- (20) 松山芳彦, 志村憲助; 酵素化学シンポジウム **3**, 28 (1949)
- (21) Cooper, E. A. and Mason, J.: J. Hyz., **23**, 119 (1927)
- (22) Willstätter, P. and Goassmann, W.: Z. physiol. Chem., **151**, 236 (1926)

Synthesis of Benzene Hexachloride by Silent Discharge. Minoru NAKAZIMA, Yasuyuki MORIZUKI, Takasi MATUMURA and Tosiyo YOSIDA (Laboratory of Agricultural Chemicals, Kyoto University) Received Feb. 10, 1952, *Boiyu-Kagaku* **17**, 6, 1952 (with English résumé 10)

2. BHC の放電合成に関する研究 中島 稔, 望月安行, 松村 隆, 吉田敏郎 (京都大学農薬化学研究室) 27. 2. 10 受理

BHC の製造法に関しては多くの特許が提出され、特に BHC 中の γ 含量を種々な触媒を用いて増加せしめんとする特許も多いが、現在の所いづれも未だ確実性に乏しい様である。私達は多塩化 cyclohexene の塩素化反応の研究から BHC 中の γ 含量を増加せしめるには出来るだけ強い条件の下でベンゼンを塩素化する必要があると考えて、無声放電電場内でベンゼンと塩素を反応させて BHC を合成する研究を行つた。

無声放電の化学作用に関しては古くから研究が行われているが未だに明確な理論はなく、特に有機合成反応に放電の化学作用を応用した研究はなかつたが最近杉野氏等⁽¹⁾は放電場内でベンゼンとアンモニア瓦斯からアニリンを、又ベンゼンと酸素とからフェノールを合成した。

私達は先づ予備試験として図に示す如きオゾナイザー放電管と同形式の小型反応管を用い、BHC の放電合成に及ぼす光線、温度及びベンゼンと塩素の混合比等の影響について実験した。

光線の影響については、放電場内では光又はアルカリの存在なくとも γ 含量の高い BHC (γ 含量 18~

20%) が生成するが反応速度が極めておそく反応率が悪い。又生成した BHC は光線法のものより幾分橙色を帯びている。そこで反応管の両側に 40W の蛍光灯 2 基を設け、光線を照射し乍ら放電合成を試みた所、 γ 含量は余り変化せぬが反応率は非常に良く又生成した BHC の品質は極めて良好となつた。従つて以後の放電合成実験には全て光線を併用した。

温度の影響は γ 含量、反応率共に 20~30° 附近が最も良い様に思われ温度が余り低くても高くても、いづれも良くない結果を得た。又生成した BHC は高温のもの程橙色が強く悪臭も強い様である。又反応時間を延長すると反応率は各温度とも一様に増大するが γ 含量は逆に低下する。之は反応時間を長くすると置換反応が増し γ 含量が低下するものと思われる。

次にベンゼンと塩素の混合比を調べるため、反応温度及びベンゼンの流下時間を一定にして塩素の流通量を変化して反応せしめた所、混合比 (ベンゼンと塩素の重量比) が 3~4 附近が、BHC の生成率及び γ 含量共に最適である様に思われる。普通の光線法では混合比は大抵 5 附近であり、之より小即ち塩素量が大となると反応管壁に結晶が附着し易くなるが、放電合成では結晶は管壁に附着し難く又仮え附着してもはがれ

昭和 26 年 5 月 BHC 研究会で一部発表